

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-308590

(43) 公開日 平成8年(1996)11月26日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	A
// (C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:125)				

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平7-145549

(22) 出願日 平成7年(1995)5月18日

(71) 出願人 591065549

福岡県

福岡県福岡市博多区東公園7番7号

(71) 出願人 391043332

財団法人福岡県科学技術振興財団

福岡県福岡市博多区東公園7番7号

(71) 出願人 591027927

福岡県醤油醸造協同組合

福岡県筑紫野市大字牛島65

(72) 発明者 大場 孝宏

福岡県久留米市東合川3-14-9-202

(74) 代理人 弁理士 加藤 久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸の製造方法

(57) 【要約】

【構成】 ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸を産生する細菌を土壌中から分離し、この細菌を焼酎蒸留廃液を培地として培養してポリ- $\gamma$ -グルタミン酸を産生させる。好ましい細菌は、バチルス・ズブチルス属のもの、特にバチルス・ズブチルス新菌株TN-4（生命工学工業技術研究所受託番号FERM P-14871）である。

【効果】 焼酎蒸留廃液を培地として有効利用し、しかも該培地成分から効率的にポリ- $\gamma$ -グルタミン酸を製造する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリマーグルタミン酸を産生する細菌を土壤中から分離し、焼酎蒸留廃液を培地として該細菌を培養してポリマーグルタミン酸を産生させることを特徴とするポリマーグルタミン酸の製造方法。

【請求項2】 ポリマーグルタミン酸を産生する細菌が、バチルス・ズブチルスであることを特徴とする請求項1の製造方法。

【請求項3】 ポリマーグルタミン酸を産生する細菌が、バチルス・ズブチルス新菌株TN-4（生命工学工業技術研究所受託番号FERM P-14871）であることを特徴とする請求項2の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、工業的に有用な機能性高分子の一つであるポリマーグルタミン酸を製造する方法に関し、詳しくは、細菌を用いてポリマーグルタミン酸を製造する新規な方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ポリマーグルタミン酸は、食品、医薬品、化粧品などの多くの分野において機能性ポリマー材料として期待されている。このポリマーグルタミン酸は、特許出願公開平3-130090号公報、特許出願公開平1-174397号公報、特許出願公告昭43-24472号公報、農化43巻595号（1969）、農化45巻118号（1971）などに記載されているように、細菌を培養して製造されている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】これらの文献や公報類に記載されているように、現在、細菌を培養するポリマーグルタミン酸の製造は専ら、合成培地で行われている。例えば、ポリマーグルタミン酸産生に必要な代表的な合成培地としてグルタミン酸（70 g/L）が添加された合成培地においてバチルス・ズブチルス菌を37℃で4日間培養すると、48.0 g/Lのポリマーグルタミン酸が得られるとされている（Kubota et al :Bio sci. Biotech. Biochem., 57, 1212 (1993)）。

【0004】しかし、合成培地を用いる製造法では、添加された栄養成分の量とポリマーグルタミン酸の産生量を比較すると、栄養成分が必ずしも効率的にポリマーグルタミン酸へ転換されているとはいえない。したがって、さらに効率的なポリマーグルタミン酸の新規製造法の開発が望まれる。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、培地として焼酎蒸留廃液を用いることによりポリマーグルタミン酸を収率よく産生させることができること、特にこのような条件下においてポリマーグルタミン酸の産生能力が極めて高い新規の細菌を分離することによりこれらの課題を解決した。

【0006】以下に、本発明を詳細に説明する。本発明は、ポリマーグルタミン酸を産生する能力を有する細菌を焼酎蒸留廃液培地で培養するポリマーグルタミン酸の製造法を提供する。本発明において使用する細菌は、ポリマーグルタミン酸を菌体外に産生する菌株であればいずれも使用可能であるが、特にバチルス属菌種が望ましい。具体的な例としては、バチルス・ズブチルス（*Bacillus subtilis*）、バチルス・リケニホルミス（*Bacillus licheniformis*）などが用いられる。

【0007】本発明に特に好適な細菌は、本発明者らにより分離され、TN-4株と称するものである。TN-4は、福岡県内の土壌より分離され、菌学的性状は次のとおりである。

## 1. 形態的性質

本菌株の栄養細胞は0.6～1.0×2.0～3.0ミクロンの桿菌である。30℃、2～3日の培養で内生孢子の形成がみられる。内生孢子の大きさは、0.6～1.0×1.5～1.7ミクロンの長円形である。孢子位置は、中立から亜端立で、孢子嚢は非膨出である。細胞は運動性を有し、グラム染色は陽性である。

## 2. 生理的性質

(1) 硝酸塩の還元：陽性

(2) V-P反応：陽性

(3) V-PブロスのpH：5.2

(4) グルコースからの酸の生成：陽性

(5) グルコースからのガスの生成：陰性

(6) ゼラチンの液化：陽性

(7) デンプンの分解：陽性

(8) クエン酸の利用：陽性

(9) プロピオン酸の利用：陰性

(10) 卵黄反応：陰性

(11) カタラーゼ：陽性

(12) 生育の範囲：15～50℃の温度範囲で生育するが、55℃では生育しない。pH 5.7でも生育する。7% NaCl存在下でも生育する。

(13) 酸素に対する態度：好気性であり、嫌気下で生育しない。

以上の通り、本菌株は形態的・生理学的性質を総合するとバチルス属のバチルス・ズブチリスと考えられる。そこで、本発明者らは、既知株と区別するため本菌株をバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）TN-4と命名した。本菌株は、工業技術院生命工学工業研究所に受託番号FERM P-14871として寄託されている。したがって、本発明は、別の観点として、バチルス・ズブチリス属の新菌株を提供する。なお、TN-4株は、他の細菌と同様に、自然的あるいはエックス線、薬品などを用いる人工的変異手段で容易に変異しうるが、このような変異株であってもTN-4と同様のポリマーグルタミン酸を産生する能力を保有している限りは、本発明の方法に使用できる。

【0008】本発明の方法は、TN-4で代表されるバチルス・ズブチルス株を用いれば、合成培地によらず焼酎蒸留廃液を培地とすることによって極めて効率的にポリ-γ-グルタミン酸が製造できることに基づくものである。このような本発明に使用する焼酎蒸留廃液中は、一般に0.1から2g/Lのグルタミン酸、0.1から2g/Lのグルコースおよび1から5g/Lのクエン酸から構成され、特に、比較的高濃度のクエン酸を含有していることが特徴的である。焼酎蒸留廃液としては、麦焼酎蒸留廃液の他、米、芋、そばなど各種原料の焼酎蒸留廃液を培地として使用できる。

【0009】培養は、振盪培養などの好氣的条件下で行なう。培養温度は25～40℃の範囲が適当である。培養時のpHは5～9、好ましくは6～8が適当である。培養期間はポリ-γ-グルタミン酸の蓄積量が最大に達するまで培養すればよく、通常2～3日間である。培養物からのポリ-γ-グルタミン酸の単離は、従来から行なわれている分離採取法によって行なう。以上説明した本発明の方法によれば、ポリ-γ-グルタミン酸を産生させるために必要な培地中のグルタミン酸の量は、従来の合成培地を用いる場合に比べて数十分の1程度にすぎないことが見出されている。

【0010】本発明で得られるポリ-γ-グルタミン酸の物理化学的性状はつぎのとおりである。

- 1) 白色の粉末
- 2) 6N-HClの加水分解によりグルタミン酸のみが検出される。
- 3) 水に可溶。エタノール、アセトン等の有機溶媒に不溶。
- 4) ペプシンにより分解されず、γ-グルタミルトランスベプチダーゼにより分解されることから、ポリ-γ-グルタミン酸である。
- 5) D-グルタミン酸とL-グルタミン酸の構成比は、それぞれ65%、35%である。

【0011】

【実施例】以下、本発明の実施例を示すが、本発明はこれらに限定されたものではない。

【実施例1】

〔新規バチルス・ズブチルス分離株TN-4の単離〕福

岡県内の土壌0.5gを滅菌水4.5mlを入れた試験管に秤取り、十分に懸濁させた。この土壌懸濁液を70℃の水浴中で10分間放置し、熱処理を行った。次にこの試料を焼酎蒸留廃液寒天培地（焼酎蒸留廃液1リットル、寒天15g、pH6.5）に0.1ml塗抹し、30℃で2日間培養した。所定期間培養後生育してきたコロニーを焼酎蒸留廃液培地（pH6.5）で振とう培養し、ポリ-γ-グルタミン酸の生産が見られたものを選択した。

【0012】〔実施例2〕

〔焼酎蒸留廃液培地における新規バチルス・ズブチルスTN-4株のポリ-γ-グルタミン酸生産〕固形分を除いた麦焼酎蒸留廃液上清（pH3.8、表1）を、水酸化ナトリウム水溶液でpHを6.5に調整し、この100mlを300ml三角フラスコに分注し、121℃、20分間蒸気殺菌した。これにバチルス・ズブチルスTN-4を接種し、120rpm、30℃、3日間振とう培養を行い、13.1g/Lのポリ-γ-グルタミン酸を得た。

【0013】

【表1】

主な成分	g/L
グルタミン酸	0.39
グルコース	0.94
クエン酸	1.74

【0014】表2に示すように、実施例2による焼酎蒸留廃液からのポリ-γ-グルタミン酸製造法によれば従来の技術である前述したKubotaらの報告に比べてポリ-γ-グルタミン酸1gを生産するために必要なグルタミン酸の量が45分の1程度でよい。すなわち、本発明は従来の技術よりグルタミン酸が効率的にポリ-γ-グルタミン酸へ変換されている。したがって、本発明は効率的なポリ-γ-グルタミン酸の新規製造法である。

【0015】

【表2】

	グルタミン酸 (g/L)	ポリ-γ-グルタミン酸 生産量(g/L)	グルタミン酸 ポリ-γ-グルタミン酸生産量
合成培地 <sup>1</sup>	70	48.0	1.4(46.6)
焼酎蒸留廃液 <sup>2</sup>	0.39	13.1	0.030(1)

1: Kubotaらの報告による。

2: 実施例2による。

【0016】〔実施例3〕

〔各種焼酎蒸留廃液からの新規バチルス・ズブチルスTN-4株によるポリ-γ-グルタミン酸の生産〕各種焼酎蒸留廃液を用いて、実施例2と同様の方法で、バチル

ス・ズブチルスTN-4によるポリ-γ-グルタミン酸の生産を行ったところ、表3の結果を得た。

【0017】

【表3】

焼酎蒸留廃液	ポリ-γ-グルタミン酸蓄積量(g/L)
麦焼酎蒸留廃液	13.1
米焼酎蒸留廃液	11.6
芋焼酎蒸留廃液	7.9
そば焼酎蒸留廃液	9.6

【0018】なお、用いた焼酎蒸留廃液中の組成は次のとおりである。米焼酎蒸留廃液：0.28g/L（グルタミン酸；Glu）、0.92g/L（グルコース；G）、1.71g/L（クエン酸；C）、芋焼酎蒸留廃液：0.20g/L（Glu）、0.62g/L（G）、1.56g/L（C）、そば焼酎蒸留廃液：0.24g/L（Glu）、0.85g/L（G）、1.65g/L（C）。

【0019】

【発明の効果】本発明により焼酎蒸留廃液を培地としてポリ-γ-グルタミン酸を製造することができる。本発明の製造法は、産業廃棄物である焼酎蒸留廃液を有効利用し、しかも、培地成分から効率的にポリ-γ-グルタミン酸を製造している点において、極めて経済的である。

フロントページの続き

(72)発明者 野見山 修治  
福岡県筑紫野市塔原449-13-303  
(72)発明者 藤 信和  
福岡県粕屋郡篠栗町大字高田350

(72)発明者 野田 義治  
福岡県太宰府市青山4-18-14  
(72)発明者 大場 和徳  
福岡県甘木市大字馬田1542  
(72)発明者 白石 淳  
福岡県粕屋郡久山町大字山田1891-2